

500,050

10/500050

( ) 許協力条約に基づいて公開された国際出願

Rec'd P&amp;T/PTO 25 JUN 2004

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2003年7月17日 (17.07.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/057880 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, C12Q 1/68, G01N 33/566, A61K 45/00, 39/395, 48/00, A61P 43/00 (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府 大阪市 中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/13782
- (22) 国際出願日: 2002年12月27日 (27.12.2002) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小林 真 (KOBAYASHI, Makoto) [JP/JP]; 〒651-2276 兵庫県神戸市 西区春日台七丁目5-5 Hyogo (JP). 荒井 俊光 (ARAI, Toshimitsu) [JP/JP]; 〒565-0823 大阪府 吹田市 山田南50番B-202号 Osaka (JP). 松村 歩佳 (MATSUMURA, Fumika) [JP/JP]; 〒305-0035 茨城県つくば市 松代3丁目12-1 武田松代レジデンス 613号 Ibaraki (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2001-400280  
2001年12月28日 (28.12.2001) JP

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF QUANTIFYING NUCLEIC ACID AND KIT FOR QUANTIFYING NUCLEIC ACID

(54) 発明の名称: 核酸の定量方法及び核酸定量キット

(57) Abstract: It is intended to provide a method of quantifying a nucleic acid and a kit for quantifying a nucleic acid. More specifically, it is intended to provide a standard comprising a synthetic polynucleotide obtained by chemical synthesis which is to be used for forming a calibration curve employed for quantifying a specific target nucleic acid in a sample, a quantification method and a quantification kit using the same, a method of diagnosing a specific disease, etc. The standard is a synthetic polynucleotide obtained by chemical synthesis. Compared with the existing standards comprising biosynthesized polynucleotides, it has an advantage that a target sequence can be precisely obtained by a convenient method. Moreover, the above-described standard suffers from little biological contamination. Therefore, it is highly safe to the environment and factors disturbing highly precise quantification can be lessened therein.

(57) 要約:

本発明は、核酸の定量方法及び核酸定量キットを提供する。

具体的には、本発明は、試料中の特定の標的核酸を定量するために用いられる検量線を作成するために用いられる標準品であって、化学合成によって得られる合成ポリヌクレオチドからなる標準品、これを用いる定量方法および定量キット、特定疾患の診断方法などを提供する。

本発明の標準品は、化学合成によって得られる合成ポリヌクレオチドであり、従来の生合成によって得られるポリヌクレオチドからなる標準品と比較して、簡便な方法で目的とする配列のものを正確に得ることができるという利点がある。また、本発明の標準品は、生物学的コンタミネーションがないので、環境に対して安全であり、また高精度の定量を阻害する要因を少なくできるという利点がある。

WO 03/057880 A1



(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒104-0028 東京都中央区八重洲2丁目8番7号 福岡ビル9階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## 核酸の定量方法及び核酸定量キット

## 背景技術

- 5      本発明は、試料中の特定の標的核酸を定量するために用いられる検量線を作成するために用いられる標準品、それを用いた核酸の定量方法及び定量キットなどに関する。また、本発明は、その核酸の定量方法または定量キットを用いた特定疾患の診断方法、及びその特定された遺伝子DNAまたはその遺伝子産物を含む医薬品にも関する。
- 10      P C R (polymerase chain reaction) 法は、微量の標的核酸を指数的に増幅した後に検出することができるので、遺伝子の発現解析、疾患の診断、遺伝子組換え食品の検査、自然食品における組換え遺伝子の混入の判定などの分野において幅広く用いられている。P C R法については、例えば、米国特許第4, 6 8 3, 1 9 5号、同第4, 6 8 3, 2 0 2号及び同第4, 9 6 5, 1 8 8号などに詳しく記載されている。一般的なP C R法では、標的核酸を含み得る試料と、標的核酸に対応する一対のオリゴヌクレオチドプライマー、反応基質（デオキシヌクレオチド三リン酸）、DNAポリメラーゼなどを含む増幅試薬とを反応させ、標的核酸を指数的に増幅させることにより、微量に含まれる標的核酸の検出を容易にする。
- 15      また、P C R法において特定のmRNAを精度よく定量する方法として、蛍光プローブを用いるT a q M a n法等が知られている。例えば、特許公開第2 0 0 1-2 0 4 4 8 3号公報には、h T E R T mRNAを定量するT a q M a n法が開示されている。
- 20      一方、微量に含まれる標的核酸の定量の精度をあげるために、内部標準を用いた技術が開発されており、例えば、特開平1 1-1 2 3 0 9 5号公報に開示されている。この公報には、内部標準となるDNA配列を含有するプラスミドを、増幅試薬中に存在させ、このプラスミドが産生するcRNAを内部標準として用いる標的核酸の定量方法が記載されている。
- 25      上記方法によれば、内部標準を用いない方法と比較してより正確に標的核酸を

定量することができる。しかしながら、この方法では、内部標準となるRNAがプラスミドから反応容器内で得られるので、試薬の保存状態、反応条件、その他の要因によっては、必ずしも一定量のRNAが産生されとは限らない。また従来の酵素あるいは生物により合成された標準品はその調製が煩雑でありしばしば困難である場合が存在する。従来の方法で標準品を調製するには、配列情報を基にして目的とする生物種の細胞、臓器、ウイルスなどからゲノムDNAもしくはRNAもしくはmRNAを抽出しそこから目的とする遺伝子の断片もしくはその情報を有するDNAもしくはRNAを酵素的もしくは生物的に合成する必要がある。また、材料となる生物種には入手困難なものや強い病原性を持つものなども含まれる。さらに、標準品の調製が生物から抽出された酵素類もしくは生物そのものを用いるため標準品に高精度の定量を阻害する生物学的コンタミネーションがおこることも考えられる。

したがって、上記のような不都合がなく、簡便な方法で得られ、生物学的コンタミネーションのない標準品、及びそれを用いて標的核酸を高精度に定量できる方法があれば、疾患遺伝子の特定、特定疾患の診断、その疾患の治療等の分野で有用である。

#### 発明の開示

すなわち本発明は、以下に示す、標準品、核酸の定量方法、核酸の定量キット、特定疾患の診断方法などを提供する。

(1) 化学合成によって得られる合成ポリヌクレオチドを含む、試料中の特定の標的核酸を定量または検出する際に用いられる標準品、

(2) 前記合成ポリヌクレオチドがRNA、DNA又はそれらの修飾物である前記(1)記載の標準品、

(3) 前記合成ポリヌクレオチドがRNAまたはDNAである前記(1)記載の標準品、

(4) 前記合成ポリヌクレオチドがRNAのときにセンス鎖、あるいはDNAのときにアンチセンス鎖である前記(3)記載の標準品、

(5) 前記合成ポリヌクレオチドが標的核酸の一部を合成したものであって、ヌ

クレオチドの数が60～200個である上記(1)記載の標準品、

(6) 前記(1)～(5)のいずれかに記載の標準品を含む核酸定量キット、

(7) 前記(1)～(5)のいずれかに記載の標準品と少なくとも1対のプライマー対を含む核酸定量キット、

5 (8) さらに蛍光プローブまたはリン酸化プローブを含んでなる前記(7)記載のキット、

(9) さらにDNAポリメラーゼを含んでなる前記(8)記載のキット、

(10) さらに逆転写酵素を含む前記(9)記載のキット、

10 (11) 複数の標的核酸を定量するための核酸定量キットであって、複数の反応場所を有する反応器具の各反応場所に、標的核酸に対応するプライマー対を含む増幅試薬を充填し、その標的核酸に対応するプライマー対を充填していない反応場所に前記(1)～(5)のいずれかに記載の標準品とその標準品に対応するプライマー対を含む増幅試薬を充填してなる核酸定量キット、

(12) 前記複数の標的核酸が特定疾患に関与するDNAまたはmRNAであり、  
15 、その特定疾患を診断するために用いられる前記(11)記載の核酸定量キット、

(13) 前記複数の標的核酸が遺伝子組換え食品に含有される組換えDNAであり、食品中の組換えDNAを検知するために用いられる前記(11)記載の核酸定量キット、

20 (14) 試料中の特定の標的核酸を定量する方法であって、試料に標的核酸に対応する少なくとも一対のプライマー対をそれぞれ含む増幅試薬を加え、標準品としての化学合成ポリヌクレオチドにその合成ポリヌクレオチドに対応するプライマー対を含む増幅試薬を加えて、それぞれ増幅反応を行い、増幅された標準品の量と増幅された標的核酸の量を測定し、これらの情報に基づいて増幅前の標的核酸の量を計算する核酸の定量方法、  
25

(15) 前記合成ポリヌクレオチドがRNA、DNA又はそれらの修飾物である前記(14)記載の方法、

(16) 前記合成ポリヌクレオチドがRNAである前記(14)記載の方法、

(17) 前記合成ポリヌクレオチドがセンス鎖である前記(16)記載の方法、

(18) 前記合成ポリヌクレオチドが標的核酸の一部を合成したものであって、ヌクレオチドの数が60～200個である前記(14)～(17)記載の方法、

(19) 前記試料がヒトまたはその他の動物由来のmRNA試料である前記(14)～(18)記載の方法、

5 (20) 前記増幅試薬がさらに蛍光プローブまたはリン酸化プローブを含んでなる前記(19)記載の方法、

(21) 前記増幅試薬がさらにDNAポリメラーゼを含んでなる前記(20)記載の方法、

(22) 前記増幅試薬がさらに逆転写酵素を含む前記(21)記載の方法、

10 (23) (1) 標的核酸に対応する少なくとも一対のプライマー対をそれぞれ含む増幅試薬に含まれる蛍光プローブまたはリン酸化プローブのプローブ部分が、標的核酸のうち該プライマー対に挟まれる領域の核酸からなるプローブであり、

(2) 合成ポリヌクレオチドに対応するプライマー対を含む増幅試薬に含まれる蛍光プローブまたはリン酸化プローブのプローブ部分が、合成ポリヌクレオチドのうち該プライマー対に挟まれる領域の核酸からなるプローブである前記(20)～(22)記載の方法、

15 (24) DNAポリメラーゼによって蛍光プローブまたはリン酸化プローブから遊離される蛍光物質の蛍光強度またはリン酸基の量を指標として、増幅された標準品の量と増幅された標的核酸の量を測定する前記(23)記載の方法、

20 (25) 前記(11)記載のキット又は前記(14)の方法を用いてSNPの解析を行う方法、

(26) 前記(12)記載のキット又は前記(14)の方法を用いて特定疾患を診断する方法、

25 (27) 前記(13)記載のキット又は前記(14)の方法を用いて食品中に遺伝子組換えDNAが含まれているか否かを判定する方法、および

(28) 前記(12)記載のキット又は前記(26)記載の方法によって特定される、ある細胞や組織において特徴的に発現が亢進または減少している遺伝子DNAもしくはその遺伝子産物、又はその遺伝子産物に対するアゴニスト、アンタゴニストもしくは抗体を含んでなる医薬。

以下、本発明について詳細に説明する。

発明を実施するための最良の形態

(標準品)

- 5       まず、本発明の標準品は、試料中の特定の標的核酸を定量又は検出する際に用いられる標準品であって、化学合成によって得られる合成ポリヌクレオチドを含むことを特徴とする。ここで、「標準品」とは、標的核酸を増幅し、得られた増幅生成物の量から、増幅前の標的核酸の量を計算する際に用いられる検量線を作成するため、あるいはSNPなどの特定の核酸配列を検出する際に用いられる標準品のことをいう。検量線の作成、増幅前の標的核酸の計算方法などについては後述する。

- 15       本発明で用いる標準品は、合成ポリヌクレオチドであり、好ましくは、化学合成によって得られた1本鎖もしくは2本鎖RNA、1本鎖もしくは2本鎖DNA又はそれらの修飾物である。ここで、「修飾物」とは、一部が化学修飾されたものをいい、例えば、(1) プリン環および/またはピリミジン環が化学修飾されたもの(例えば、メチル化されたプリンおよびピリミジン環、アシル化されたプリンおよびピリミジン環などを有するもの)、あるいはその他の複素環を含むもの、(2) 糖部分が化学修飾されたもの(例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能
- 20       基に変換されているもの)、(3) ビオチン化されたもの、(4) FITC化されたもの、(5) ジゴキシゲニンで修飾されたもの、(6) リン酸化されたもの、(7) ペルオキシダーゼで修飾されたもの、(8) アルカリホスファターゼで修飾されたもの、(9) ルシフェラーゼで修飾されたものなどが挙げられる。

- 25       化学合成によれば、単一の化学構造を有する目的ポリヌクレオチドを必要な量だけ確実に得ることができるので、本発明では化学合成ポリヌクレオチドが使用される。

      本発明の標準品は、好ましくは、化学合成によって得られた1本鎖RNAであり、より好ましくは化学合成によって得られたセンス鎖である。また、化学合成による一本鎖DNAを用いる際は好ましくはアンチセンス鎖を用いるのがよい。

2本鎖より、1本鎖のほうが、被定量物に近い状態のものを標準とすることができるので、定量の精度が向上するからである。

本発明の合成ポリヌクレオチドとしては、標的核酸またはその一部の塩基配列と同一の塩基配列を有する合成ポリヌクレオチドであり、従来の生合成によって得られる標準品と同様の配列を有するものを用いることができる。このような標準品としては、18SリボソームRNA (18S Ribosomal RNA)、酸性リボソームタンパク質 (Acidic Ribosomal Protein)、ベータアクチン ( $\beta$ -actin)、サイクロフィリン (Cyclophilin)、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、ホスフォグリセロキナーゼ (Phosphoglycerokinase)、ベータ2-ミクログロブリン ( $\beta$ 2-Microglobulin)、ベータ-グルクロニダーゼ ( $\beta$ -Glucuronidase)、ヒポキサンチンリボシルトランスフェラーゼ (Hypoxanthine Ribosyl Transferase)、転写因子IID (Transcription Factor IID) / TATA結合因子 (TATA Binding Factor)、トランスフェリンレセプター (Transferrin Receptor) 等が挙げられる。

当業者であれば、公知の配列に基づき、化学合成によって本発明の標準品であるポリヌクレオチドを合成することは容易である。公知のポリヌクレオチドの合成方法として、例えば、ホスホアミダイド法、H-ホスフェート法等が知られている。

ホスホアミダイド法については、例えば、Wu, T., Ogilvie, K. K., and Pon, R. T. (1989). Prevention of chain cleavage in the chemical synthesis of 2'-O-silylated oligoribonucleotides. Nucl. Acids Res. 17, 3501-3517; Stawinski, J., Stromberg, R., Thelin, M., and Westman, E.. (1988); Studies on the t-butyl dimethyl-silyl group as 2'-O-protection in oligoribonucleotide synthesis via the H-phosphonate approach. Nucl. Acids Res. 16, 9285-9288; Scaringe, S. A., Franklyn, C., and Usman, N. (1990). Chemical synthesis of biologically active oligoribonucleotides using t-butyldimethyl-silyl protected ribonucleoside phosphoramidites. Nucl. Acids Res. 18, 5433-5441; Chaix, C., Molko, D. and Teoule, R. (1989). The use of labile base protecting groups in oligoribonucleotide synthesis. Tetrahedron Lett. 30, 71-74; Gasparutto



- , D., Livache, T., Bazin, H., Duplaa, A. M., Guy, A., Khorlin, A., Molko, D., Roget, A., and Teoule, R. (1992); Chemical synthesis of a biologically active natural tRNA with its minor bases. *Nucleic Acids Res.* 20, 5159-5166; Vinayak, R., Anderson, P. McCollum, C., and Hampel, A. (1992). Chemical synthesis of RNA using fast oligonucleotide deprotection chemistry. *Tetrahedron Lett.* 31, 7269-7272などの文献に記載されている。また、H-ホスフェート法については、例えば、Garegg, P. J., Regberg, T., Stawinski, J. and Stromberg, R. (1985). Formation of internucleotidic bonds via phosphonate intermediates. *Chem. Scripta* 25, 280-282; Garegg, P. J., Regberg, T., Stawinski, J. and Stromberg, R. (1986). Nucleoside hydrogenphosphonates in oligonucleotide synthesis. *Chem. Scripta* 26, 59-62; Garegg, P. J., Lidh, I., Regberg, T., Stawinski, J. and Stromberg, R. (1986); Nucleoside H-phosphonates. III. Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the hydrogenphosphonate approach. *Tetrahedron Lett.* 27, 4051-4054; Froehler, B. C., Ng, P. G., and Matteucci, M. D. (1986). Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates. *Nucleic Acids Res.* 14, 5399-5407; Froehler, B. C., and Matteucci, M. D. (1986). Nucleoside H-phosphonates: Valuable intermediates in the synthesis of oligonucleotides. *Tetrahedron Lett.* 27, 469-472などに記載されている。
- 20     なお、本発明で用いる合成ポリヌクレオチドは、増幅効率を考慮すると短いもののほうが好ましく、例えば、60～150mer、より好ましくは、60～100merのサイズを有する。本発明で用いる合成ポリヌクレオチドのヌクレオチドの数は特に限定されないが、通常60～200個、好ましくは60～100個である。

25

#### (核酸定量キット)

本発明において用いられる核酸定量キットは、上記標準品としての合成ポリヌクレオチドを含むものであり、さらには標的核酸に対応する少なくとも一対のプライマー対、標的核酸に対応するプローブ、DNAポリメラーゼ、緩衝液等を含

んでいてもよい。これらのキットは、必要に応じて、例えば、プライマー伸長生成物の合成を触媒する薬剤、基質のヌクレオシド三リン酸塩、標識に使用する手段（例えば、標識がビオチンならば、アビジン-酵素抱合体及び酵素の基質及び色素原）、PCR又はハイブリダイゼーション反応に適した緩衝液などを含むことができる。

ここで、本発明において用いられる「標的核酸に対応するプライマー対」とは、標的遺伝子の配列（又は標的mRNAをコードする遺伝子配列）のエクソン領域の一方の鎖に相補的又は実質的に相補的である第1のプライマーおよび該標的遺伝子配列のエクソン領域の他方の鎖に相補的又は実質的に相補的である第2のプライマーから成るプライマーの一对をいう。この第1のプライマーと第2のプライマーに挟まれるエクソン部分が増幅される。

本発明においては、これらのプライマー対を少なくとも1対以上使って、標的核酸の増幅を行う。

標的核酸を増幅させるためのプライマー対または標準品を増幅させるためのプライマー対は、その標的核酸の配列に基づいて当業者であれば容易に設計することができる（例えば、Genome Res. 1996 Oct;6(10):986-94参照）。

例えば、標的核酸として、hMOR1 cDNAが選択される場合は、hMOR1 cDNA（配列番号1）の1129～1210位の相補配列のものを化学合成して標準品とすることができる。この場合は、上流プライマーとして5'-CC TTGTTACAATCCCAGAACTAC-3'（配列番号：2）を、下流プライマーとして5'-A GGCAGCTGTTTGTGTAACTAGA-3'（配列番号：3）を用いることができる。

本発明において用いられる標的核酸に対応するプローブまたは標準品である合成ポリヌクレオチドに対応するプローブは、標的配列に応じて当業者に容易に設計できる（例えば、Genome Res. 1996 Oct;6(10):986-94参照）。例えば、標的核酸に対応するプローブは、標的核酸のうち第1プライマーと第2プライマーに挟まれる領域の核酸からなるプローブである。合成ポリヌクレオチドに対応するプライマーは、合成ポリヌクレオチドのうち第1プライマーと第2プライマーに挟まれる領域の核酸からなるプローブである。本発明において用いられる適当なオリゴヌクレオチドプローブは、好ましくは約15～約50ヌクレオチドの長さ

を有し、より好ましくは約25～約35ヌクレオチドの長さを有する。オリゴヌクレオチドプローブは、生化学的、免疫化学的、又は化学的な手段によって検出可能な化学物質等を組込むことによって標識することができる。有用な標識としては、<sup>32</sup>P等の放射性同位元素、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネート等の蛍光物質、ルミノール、ルシフェリン等の発光物質、β-ガラクトシダーゼ、パーオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素、ビオチン、および抗体等があげられる。なかでも、蛍光物質で標識された蛍光プローブ、<sup>32</sup>Pで標識されたリン酸化プローブなどが好ましく用いられる。

10 本発明において用いられるDNAポリメラーゼとしては、逆転写活性および5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼ、例えば、Tth DNAポリメラーゼなどが挙げられる。

本発明においては、公知のあるいは市販されている緩衝液が用いられる（例えば、PEBiosystems社製緩衝液；Genome Res. 1996 Oct;6(10):986-94参照）。

15 なお、定量キットに含まれる各種試薬などの量は、試料の量、標的核酸の種類などに応じて適宜決定される。

本発明のより好ましい態様によれば、複数の標的核酸を定量するための核酸定量キットであって、複数の各反応場所、好ましくは複数の反応場所を有する反応器具の各反応場所に、標的核酸に対応するプライマー対をそれぞれ含む各増幅試薬を充填し、その標的核酸に対応するプライマー対を充填していない反応場所に  
20 前記請求項1～4のいずれかに記載の標準品とその標準品に対応するプライマー対を含む増幅試薬を充填してなる核酸定量キットが提供される。この定量キットを用いることにより、一度の操作で、試料中の複数の標的核酸の有無およびその量を検出することができる。

25 複数の反応場所とは、2つ以上の反応場所であれば特に限定されたいが、通常2～数万個、好ましくは2～1000個、より好ましくは10～800個、さらに好ましくは10～300個の反応場所である。

この態様では、複数の反応場所を有する反応器具が用いられ、標的核酸を含み得る試料および一連の既知濃度に設定された合成ヌクレオチドからなる標準品と各増幅試薬とのそれぞれの反応は、各反応場所で行われる。標準品の濃度はいず

れでもよいが $10^1$ コピーから $10^7$ コピー程度が各容器に入っていることが好ましい。各増幅試薬は、標的核酸またはその合成ポリヌクレオチドを増幅することができるプライマー対をそれぞれ含む。ここで用いられる反応器具は、試料と各増幅試薬とを一度に反応させることができるように、2つ以上の反応場所を有している限り、反応器具の構成及び構造は限定されない。好ましくは、本発明において用いられる反応器具として、例えば、複数の穴を有するプレート、複数のスライドグラスを備えてなる反応器具、複数の試験管を備えてなる反応器具などが挙げられる。実験スペース、操作性等を考慮した場合は、複数の穴を有するプレートを好ましく用いることができる。これらのプレートは、使用する増幅試薬の数によって決められるが、市販されている96穴または384穴プレートが好ましく用いられる。しかし、増幅試薬の数に応じて所望の数の反応場所を設けた反応器具を使うことができる。

増幅試薬の数は、標的核酸の数に応じて調整されるので、特に限定されないが、例えば、10～800種類の増幅試薬および標的に応じた合成オリゴヌクレオチドからなる標準品を含んでなる定量キットが提供される。本発明の他の態様によれば、10～300種類の増幅試薬および標的に応じた合成オリゴヌクレオチドからなる標準品を含んでなる定量キットが提供される。増幅試薬の数が多い場合は、異なるセットの増幅試薬を複数枚のプレート（例えば、2～10枚のプレート）に分けてセットしておき、定量反応を複数回に分けて行うこともできる。

#### (核酸の定量方法)

次に、本発明の核酸定量方法について説明する。

本発明の核酸を定量する方法においては、試料に標的核酸に対応する一対のプライマー対とをそれぞれ含む増幅試薬を加え、標準品としての化学合成ポリヌクレオチドにその合成ポリヌクレオチドに対応する一対のプライマー対を含む増幅試薬を加えて、それぞれ増幅反応を行い、増幅された標準品の量と増幅された標的核酸の量を測定し、これらの情報に基づいて増幅前の標的核酸の量を計算する。

## [試料及び標的核酸]

まず、本発明において対象となる試料は、標的となる核酸を含み得る試料であればよく、特に限定されない。本発明の対象となる試料は、例えば、ヒトまたはその他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）の組織あるいはその培養細胞株から採取したmRNA試料である。このような組織として、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳幹、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睪丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などが挙げられる。このようなmRNA試料を用いて、その試料中に含まれる標的mRNAを定量することによって、mRNA試料を採取した部位における標的遺伝子の発現レベルを解析することができる。

また、ある特定の疾患を罹患している患者由来のmRNA試料を用いれば、その疾患に関与している遺伝子（例えば、GPCR遺伝子）の特定が容易となる。特に、複数の遺伝子に関与しているといわれる癌などの多遺伝子関与疾患に関与するGタンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャンネル遺伝子を特定する場合は、本発明によれば、各遺伝子の発現レベルを一度の定量操作で調べることができるので、関与遺伝子・タンパク質の特定が容易となる。

本発明においては、上述したとおり、本発明の合成ポリヌクレオチドを試料中の特定の標的核酸の定量・検出用標準品として用いることにより、（１）複数の遺伝子個々の発現量をまとめて定量解析することにより、ある細胞または組織においてその発現が特徴的に亢進または減少している遺伝子を同定したり、（２）特定の遺伝子ファミリーに属する複数の遺伝子の発現解析をまとめて行うことにより、その遺伝子ファミリーの中で、ある細胞または組織においてその発現が特徴的に亢進または減少している遺伝子を、その発現量の絶対値を算出することで同定することができる。

複数の遺伝子とは、2個以上の遺伝子を意味し、上限は実施可能な限り、特に限定されないが、通常2～数万個、好ましくは2～1000個、より好ましくは10～800個、さらに好ましくは10～300個の遺伝子である。

- ここで、「遺伝子の発現が特徴的に亢進または減少している」とは、正常細胞
- 5 または組織における遺伝子の発現と比較して、生理学的有意さがみられる程度に大量にまたは少量に発現していることをいう。本発明において標的とする遺伝子ファミリーは、特に限定されないが、例えば、Gタンパク質共役型レセプター遺伝子ファミリー、チロシンリン酸化酵素型レセプター遺伝子ファミリー、イオンチャンネル遺伝子ファミリー、または転写因子、トランスポーター、プロテインキナーゼ、
- 10 プロテインフォスファターゼ、プロテアーゼ、ヒートショックプロテイン、ATPaseもしくはDNA結合プロテインのいずれかに関連する遺伝子ファミリーなどから選択される。

遺伝子発現量の定量または遺伝子発現量の絶対値の算出は、後述する標的mRNAの定量法に従って行うことが出来る。

- 15 また、本発明によれば、遺伝子組換え食品に含有されるDNAを標的核酸とすることによって、遺伝子組換え食品の検査、または遺伝子組換え技術を使用せずに得られた自然食品に、組換え遺伝子が混入しているか否かの判定を行うことができる。

- 20 なお、公知の遺伝子組換え食品としては、大豆、ジャガイモ、トウモロコシ、トマト、パパイヤなどが知られている。そして、その組換え遺伝子、これを検出するためのプライマー対、一般的定量方法なども公知であり、例えば、「JAS分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル 定量的PCR編」、平成13年4月、東京農林水産消費技術センター発行などに記載されている。

- 25 例えば、トウモロコシCB351検出用として、5'—CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA—3'（配列番号：5）と5'—GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC GT—3'（配列番号：6）からなるプライマー対が知られている。また、パパイヤ55—1検出用として、5'—TTA CGG CGA GTT CTG TTA GG—3'（配列番号：7）と5'—CAT GTG CCT GAG AAA TAG GC—3'（配列番号：8）からなるプライマー対

が知られている。また、ジャガイモNew Leaf Y検出用として、5'-AAA AGA GCT GTC CTG ACA GC-3' (配列番号: 9) と 5'-TCC TCC TGC ATC AAT TGT GT-3' (配列番号: 10) からなるプライマー対が知られている。

本発明のほかの態様によれば、標的核酸は、Gタンパク質共役型レセプター、  
5 チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャネルなどをコードする遺伝子DNA又はそのmRNAである。この場合、標的Gタンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャネルなどのファミリーに属する遺伝子のmRNAに対応するプライマー対を含んでなる各増幅試薬とmRNA試料とを、反応器具の各反応場所において接触させることにより、増幅反応させ  
10 、mRNA増幅生成物を定量することによって、そのmRNA試料中に含まれていたGタンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャネルなどのファミリーに属する遺伝子の発現量を測定することができる。

本発明の他の態様によれば、全ての公知のGタンパク質共役型レセプター、チ  
15 ロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャネルなどのファミリーに属する遺伝子のmRNAに対応するプライマー対を全て準備し、そのプライマー対をそれぞれ含む増幅試薬を各反応場所にセットしておけば、一度の定量作業で、mRNA試料中において、どのGタンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャネルなどのファミリーに属する遺伝子のmRNA  
20 がどの程度産生していたかを知ることができる。勿論、必要に応じて、異なるセットの増幅試薬を複数枚のプレートに分けてセットしておき、定量反応を複数回に分けて行うこともできる。

本発明の他の態様によれば、ある一群のGタンパク質共役型レセプター、チロ  
シンリン酸化酵素型レセプター、またはイオンチャネルのファミリーに属する遺  
25 伝子のmRNAに対応する一群のプライマー対を用いることにより、一度の定量操作で、その一群のGタンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、またはイオンチャネルなどのファミリーに属する遺伝子のなかで高発現しているGタンパク質共役型レセプター、チロシンリン酸化酵素型レセプター、またはイオンチャネルなどのファミリーに属する遺伝子を特定することができ

る。

なお、現在、Gタンパク質共役型レセプター（または遺伝子）として次のものが公知である。

- (1) アセチルコリンレセプター:  $M_1$ ;  $M_2$ ;  $M_3$ ;  $M_4$ ;  $M_5$
- 5 (2) アデノシンレセプター:  $A_1$ ;  $A_{2A}$ ;  $A_{2B}$ ;  $A_3$
- (3) アドレノセプター (Adrenoceptors) :  $\alpha 1A$ ;  $\alpha 1B$ ;  $\alpha 1D$ ;  $\alpha 2A$ ;  $\alpha 2B$ ;  $\alpha 2C$ ;  $\beta 1$ ;  $\beta 2$ ;  $\beta 3$
- (4) アンギオテンシンレセプター:  $AT_1$ ;  $AT_2$
- (5) ボンベシン (Bombesin) レセプター:  $BB_1$ ;  $BB_2$ ;  $bb_3$
- 10 (6) ブラジキニンレセプター:  $B_1$ ;  $B_2$
- (7) カルシトニン・アイニリン・CGRP及びアドレノメヅリン (adrenomedullin) レセプター:
- (8) カンナビノイドレセプター:  $CB_1$ ;  $CB_2$
- (9) ケモカインレセプター:  $CCR_1$ ;  $CCR_2$ ;  $CCR_3$ ;  $CCR_4$ ;  $CCR_5$ ;  $CCR_6$ ;  $CCR_7$ ;
- 15  $CCR_8$ ;  $CCR_9$ ;  $CCR_{10}$ ;  $CXCR_1$ ;  $CXCR_2$ ;  $CXCR_3$ ;  $CXCR_4$ ;  $CXCR_5$ ;  $CX_3CR_1$ ;  $XCR_1$ ;
- (10) ケニオタクチックペプチド (Cheniotactic) レセプター:  $C3a$ ;  $C5a$ ;  $fMLP$
- (11) コレシストキニン及びガストリン (Cholecystokinin and gastrin) レセプター:  $CCK_1$ ;  $CCK_2$
- 20 (12) コーチコトロピン放出因子 (Corticotropin-releasing factor) レセプター:  $CRF_1$ ;  $CRF_2$
- (13) ドーパミンレセプター:  $D_1$ ;  $D_2$ ;  $D_3$ ;  $D_4$ ;  $D_5$
- (14) エンドセリンレセプター:  $ET_A$ ;  $ET_B$
- (15) ガラニンレセプター (Galanin receptors) :  $GAL_1$ ;  $GAL_2$ ;  $GAL_3$
- 25 (16) グルタメートレセプター:  $mglu_1$ ;  $mglu_2$ ;  $mglu_3$ ;  $mglu_4$ ;  $mglu_5$ ;  $mglu_6$ ;  $mglu_7$ ;  $mglu_8$
- (17) グリコプロテインホルモン (Glycoprotein hormone) レセプター:  $FSH$ ;  $LSH$ ;  $TSH$
- (18) ヒスタミンレセプター:  $H_1$ ;  $H_2$ ;  $H_3$ ;  $H_4$



- (19) 5-HTレセプター: 5-HT<sub>1A</sub>; 5-HT<sub>1B</sub>; 5-HT<sub>1D</sub>; 5-HT<sub>1B</sub>; 5-HT<sub>1F</sub>; 5-HT<sub>2A</sub>; 5-HT<sub>2F</sub>; 5-HT<sub>2C</sub>; 5-HT<sub>3</sub>; 5-HT<sub>4</sub>; 5-HT<sub>5A</sub>; 5-HT<sub>5B</sub>; 5-HT<sub>6</sub>; 5-HT<sub>7</sub>
- (20) ロイコトリエンレセプター: BLT; CysLT<sub>1</sub>; CysLT<sub>2</sub>
- (21) リソフォスホリピッド (Lysophospholipid) レセプター: edg1; edg2; edg3; edg4
- (22) メラノコーリン (Melanocortin) レセプター: MC<sub>1</sub>; MC<sub>2</sub>; MC<sub>3</sub>; MC<sub>4</sub>; MC<sub>5</sub>
- (23) メラトニンレセプター: MT<sub>1</sub>; MT<sub>2</sub>; MT<sub>3</sub>
- (24) ニューロペプチドYレセプター: Y<sub>1</sub>; Y<sub>2</sub>; Y<sub>4</sub>; Y<sub>5</sub>; Y<sub>6</sub>
- (25) ニューロテンション (Neurotension) レセプター: NTS1; NTS2
- 10 (26) オピオイド: DOP; KOP; MOP; NOP
- (27) P2Y レセプター: P2Y<sub>1</sub>; P2Y<sub>2</sub>; P2Y<sub>4</sub>; P2Y<sub>6</sub>; P2Y<sub>11</sub>; P2Y<sub>12</sub>
- (28) パーオキシソームプロリフェレータ (Peroxisome proliferator) 活性化レセプター: PPAR- $\alpha$ ; PPAR- $\beta$ ; PPAR- $\gamma$
- (29) プロスタノイド (Prostanoid) レセプター: DP; FP; IP; TP; EP<sub>1</sub>; EP<sub>2</sub>; EP<sub>3</sub>; EP<sub>4</sub>
- 15 (30) プロテアーゼ活性化 (Protease-activated) レセプター: PAR1; PAR2; PAR3; PAR4
- (31) ソマトスタチン (Somatostatin) レセプター: sst<sub>1</sub>; sst<sub>2</sub>; sst<sub>3</sub>; sst<sub>4</sub>; sst<sub>5</sub>
- 20 (32) タチキニン (Tachykinin) レセプター: NK<sub>1</sub>; NK<sub>2</sub>; NK<sub>3</sub>
- (33) チロトロピン放出ホルモン (Thyrotropin-releasing hormone) レセプター: TRH<sub>1</sub>; TRH<sub>2</sub>
- (34) ウロテンシン-II (Urotensin-II) レセプター:
- (35) バソアクティブインテスティナルペプチド (Vasoactive intestinal peptide) 及びピチュイタリアデニレートサイクラーゼ活性ペプチド (pituitary adenylate cyclase activating peptide) レセプター: VPAC<sub>1</sub>; VPAC<sub>2</sub>; PAC<sub>1</sub>
- 25 (36) バソプレシン (Vasopressin) 及び オキシトシン (oxytocin) レセプター: V<sub>1a</sub>; V<sub>1b</sub>; V<sub>2</sub>; OT

また、現在、チロシンリン酸化酵素型レセプター、イオンチャネル遺伝子な

どのファミリーに属する遺伝子として、次のものが公知である。

(37) イオンチャネル:  $\text{Na}^+$ チャネル (タイプI; タイプII/タイプIIA; タイプIII; SCL11/NaG; PN1; NaCh6; NaDRG; SkM1/ $\mu$ 1, SkM2)、 $\text{K}^+$ チャネル (Kv; EAG; KQT; IRK; ROMK; GIRK;  $\text{K}_{\text{ATP}}$ 等)、 $\text{Ca}^{2+}$ チャネル ( $\alpha$ 1G;  $\alpha$ 1E;  $\alpha$ 1S;  $\alpha$ 1C;  $\alpha$ 1D;  $\alpha$ 1B;  $\alpha$ 1A; IP3; リアノジンレセプターなど)、 $\text{Cl}^-$ チャネル ( $\text{GABA}_A$ ;  $\text{GABA}_C$ ; グリシンレセプター; C1C0; C1C1; CFTRなど)、非選択性カチオンチャネル (nAChR; 5-HT<sub>3</sub>; NMDA; AMPA;  $\text{P}_{2X}\text{ATP}$ ; CNGなど) など

(38) チロシンリン酸化酵素レセプター: インスリンレセプター; EGFレセプターなど

- 10 本発明において用いられる核酸の定量方法は、ヒトGPCRの機能解析、SNP解析、遺伝子組換え食品の判定以外にも種々の用途に用いることができる。例えば、判明している疾患遺伝子が産生するmRNAを検出するプライマー対を含んでなる複数の増幅試薬のセットを用いることにより、特定疾患の診断をすることができる。本発明によれば、各遺伝子の発現レベルを正確に測定することができるので、公知の方法と比較して、より正確な診断ができるという利点がある。
- 15

#### [核酸の増幅]

本発明の定量方法において、試料中に含まれ得る標的核酸は、その標的核酸を増幅させるためのプライマー対を含む増幅試薬を用いて増幅される。本発明の好ましい態様によれば、標的核酸の増幅は公知のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて行われる (米国特許第4,683,195号; 第4,683,202号; 第4,965,188号など参照)。

- 20 mRNAを標的とする場合、その標的mRNAの増幅は、最初に、例えばウィルスの逆転写酵素を用いて、標的mRNAを逆転写し、生じたcDNAを増幅することによって行うことができる。さらに好ましい態様において、mRNAの増幅は、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いて行われる (米国特許第5,310,652号; 第5,322,770号; 第5,561,058号; 第5,641,864号; 5,693,517号等参照)。
- 25

なお、本発明においては、前記ポリメラーゼ連鎖反応以外にも種々のmRNA

増幅法が用いられる。そのような増幅法として、例えば、鎖置換アッセイ法（米国特許第5,455,166号など参照）、転写に基づく増幅法（TAS）（米国特許第5,437,990号；第5,409,818号；第5,399,491号等参照）、自立配列複製法（3SR）（WO92/08800等参照）などが  
5 挙げられる。

これらの増幅反応の反応条件は、使用する試薬の種類等に応じて、当業者によって容易に設定することができる。

#### [標的核酸の定量]

- 10 次に、本発明の定量方法においては、核酸増幅生成物の生成量を定量する。増幅生成物の定量は、好ましくはプローブを使用する方法によって行われる。好ましい態様によれば、蛍光物質により標識したプローブを用いた方法によって行われる。

- 本発明のより好ましい態様によれば、標的mRNAの定量は「TaqMan法」又は「5'ヌクレアーゼアッセイ法」を用いて行われる（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、第88巻、第7276-7280頁（1991年）；米国特許第5,210,015号；第5,487,972号；第5,804,375号など参照）。しかし、必要に応じて、SYBER Green法、ハイブリダイゼーション法などを用いることもできる。TaqManアッセイ法において、5'末端を標識したプローブが用いられる。また、このプローブは、プローブがDNA合成のためのプライマーとして働くことを防ぐために3'末端が修飾される。この修飾として、リン酸基、蛍光物質等の末端への付加があげられる。標的mRNAの増幅は、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼ、例えばTth DNAポリメラーゼを用いて行われる。前記プライマーの下流の標的mRNAにハイブリダイズするプローブは、増幅反応の間、DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性によって分解される。新規に標的領域が増幅されるたびに、プローブが分解され、プローブに修飾されていた標識物質（例、リン酸基、蛍光物質）が遊離される。この遊離される標識物質を定量することにより、標的mRNA量が間接的に測定される。
- 15
- 20
- 25

遊離される標識物質を定量的に検出するためには公知の方法が用いられる。好ましい方法において、前記プローブは、2つの蛍光物質で5' および3' 末端が標識され、このうちの一方が、他方の物質の蛍光を消光することができる。このプローブは鋳型DNAにハイブリダイズしている間は2つの蛍光物質の相互作用により蛍光が消光されているが、DNAポリメラーゼが有する5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性により分解されることにより蛍光を発するようになる。増幅反応の進行に伴い蛍光が増大し、この蛍光の増大がモニターされる。

[検量線の作成及び増幅前の標的核酸量の計算]

10 本発明では、予め知られている量の標準品である合成ポリヌクレオチドを提供するので、これを増幅させて作成した「検量線」に基づいて標的核酸を含む試料の定量を行う。

15 検量線の作成については、例えば、特開平11-123095号公報に記載されている。すなわち、検量線は、ポリメラーゼ連鎖反応において作られる標準品としてのポリオリゴヌクレオチドの量を、増幅前に存在する種々の既知量のRNAに対してプロットすることによって作成される。高い精度を確保するために、増幅反応混合物の希釈度を段階的に変えた希釈系列を用いて増幅反応を行って検量線を作成する。この検量線は所定の増幅サイクル数に対して増幅される内部標準品及び標的核酸の量をプロットすることによって作成される。

20 増幅前の標的核酸の量は、増幅される標的核酸の量を上記検量線と比較することによって求められる。つまり、標準品と標的核酸の一連の希釈系列を別の反応場所において同様の条件で増幅せしめ、そしてこの反応を増幅の指数期において停止させ、増幅前にこの試料中に存在している標的核酸の量を、標準品を用いて作成される検量線に対して外挿せしめることによって決定する。

25

(疾患の診断方法およびその疾患を治療する医薬)

次に、本発明の上記(23)による方法によれば、患者から採取したmRNA試料を用いて遺伝子発現解析を行い、特定疾患関連遺伝子の特徴的発現を検知することによってその患者が罹患している疾患を診断することができる。本発明に

よれば、特定疾患関連遺伝子ファミリー（特に、特定疾患関連GPCR遺伝子ファミリー）に属する遺伝子の発現をまとめて解析することにより、複数の特定疾患関連遺伝子のなかで、どの遺伝子の発現が特徴的であるかを一度の操作で特定することができる。

- 5       したがって、このようにして特定された遺伝子の遺伝子産物に対するアゴニスト、アンタゴニストもしくは抗体、またはその遺伝子産物をコードするDNAを含む医薬は、その診断対象の患者に対して特に有効である。本発明においては、複数の異常発現遺伝子を特定することができ、かつその遺伝子の発現レベルまでも正確に定量することができる。したがって、その患者に適当な処方として、
- 10       複数のアゴニスト、アンタゴニストまたは抗体を選択し、その処方量についても、疾患関連遺伝子の発現レベルに応じて調製することができる。すなわち、本発明によれば、その患者のみに処方される、いわゆるテーラーメイド医薬の調製が可能となる。

- より詳細に述べると、例えば、生体内においてあるレセプタータンパク質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない（該レセプタータンパク質の欠乏症）患者がいる場合に、①そのレセプタータンパク質を該患者に投与し該レセプタータンパク質の量を補充したり、②（イ）本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）対象となる細胞に本発明のレセプタータンパク質をコードするDNAを挿入し
- 15       発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内におけるレセプタータンパク質の量を増加させ、リガンドの作用を充分に発揮させることができる。
- 20       本発明の医薬は、特定された遺伝子が関与する疾患の予防または治療に有効であり、例えば、中枢疾患（例えば、アルツハイマー病、痴呆、摂食障害など）、内

- 25       分泌疾患（例えば、高血圧症、性腺機能異常、甲状腺機能異常、下垂体機能異常など）、代謝疾患（例えば、糖尿病、脂質代謝異常、高脂血症など）、癌（例えば、非小細胞肺癌、卵巣癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸部癌、結腸癌、直腸癌等）などの予防または治療に有用である。

本発明で特定された遺伝子の遺伝子産物（例えば、レセプタータンパク質）、

それに対するアゴニスト、アンタゴニストもしくはその抗体、またはその遺伝子をコードするDNAを上記予防または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、DNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、そのDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。そのDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

- 10 例えば、①本発明で用いられる医薬は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明の医薬を、生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤など
- 15 とともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セル
- 20 ロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物
- 25 は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、

エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン性界面活性剤(例、ポリソルベート80<sup>TM</sup>、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトやその他の哺乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)に対して投与することができる。

本発明の医薬の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者(60kgとして)においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より

好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

(略号の表示)

- 5 本明細書において、塩基、アミノ酸、化合物等を略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づき表示を行い、その例を以下に記載する。またアミノ酸が光学異性体を取りうる場合、特に明示しなければL体を表す。

	DNA	: デオキシリボ核酸
10	cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
	a または A	: アデニン
	t または T	: チミン
	g または G	: グアニン
	c または C	: シトシン
15	u または U	: ウラシル
	RNA	: リボ核酸
	mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
	dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
	dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
20	dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
	dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
	ATP	: アデノシン三リン酸
	Gly	: グリシン
	Ala	: アラニン
25	Val	: バリン
	Leu	: ロイシン
	Ile	: イソロイシン
	Ser	: セリン
	Thr	: スレオニン



	C y s	: システイン
	M e t	: メチオニン
	G l u	: グルタミン酸
	A s p	: アスパラギン酸
5	L y s	: リジン
	A r g	: アルギニン
	H i s	: ヒスチジン
	P h e	: フェニルアラニン
	T y r	: チロシン
10	T r p	: トリプトファン
	P r o	: プロリン
	A s n	: アスパラギン
	G l n	: グルタミン
	p G l u	: ピログルタミン酸

15

本明細書の配列表記載の配列は以下のとおりである。

[配列番号：1] hMOR1 の塩基配列を表す。

[配列番号：2] 実施例1 で用いた上流プライマーN-917F の塩基配列を表す。

20 [配列番号：3] 実施例1 で用いた下流プライマーN-998R の塩基配列を表す。

[配列番号：4] 実施例1 で用いたプローブN-945T の塩基配列を表す。

[配列番号：5] トウモロコシCB351 検出用プライマーの塩基配列を表す。

。

25 [配列番号：6] トウモロコシCB351 検出用プライマーの塩基配列を表す。

。

[配列番号：7] パパイヤ55-1 検出用プライマーの塩基配列を表す。

[配列番号：8] パパイヤ55-1 検出用プライマーの塩基配列を表す。

[配列番号：9] ジャガイモNew Leaf Y検出用プライマーの塩基配列を表す。

[配列番号：10] ジャガイモNew Leaf Y検出用プライマーの塩基配列を表す。

## 実施例

- 5      以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これは本発明の範囲を限定するものではない。

### 実施例 1

(1) hMOR 1 部分配列の化学合成DNAによる検量線の作成

- 10      この例は、TaqMan法における、hMOR 1 cDNA (配列番号1 : GenBankアクセッション番号 L25119) 部分配列の化学合成DNAを用いた検量線の作成を記載する。

(2) 試料

- 15      増幅は、hMOR 1 cDNA部分配列の化学合成DNA (hMOR 1 T/M) の連続希釈溶液を用いて行った。本件のhMOR 1 COMの配列は、hMOR 1 cDNA (配列番号1) 内1129-1210位の相補配列に相当し、 $\beta$ -シアノエチルホスホアミダイド固相合成法 (化学合成法) にて合成後、アンモニアクリーページ処理を行い、ポリアクリルアミド変性ゲル電気泳動による精製を行なった。
- 20

(3) 増幅プライマー及び検出プローブ

- hMOR 1 cDNA部分配列の領域の増幅は、5' -CCTTGTTACAATCCCAGAAACT AC-3' (配列番号：2) の配列を有する上流プライマーN-917Fを、5' -AG GCAGCTGTTTGTGTAACCTAGA-3' (配列番号：3) の配列を有する下流プライマーN-998Rとを一对のプライマー対として用いて行った。
- 25

前記の上流プライマー、N-917Fは、hMOR 1 cDNA (配列番号：1) 内の1129-1153位の相補配列にハイブリダイズする。前記の下流プライマー、N-998Rは、hMOR 1 cDNA (配列番号：1) 内の118

7-1210位の配列にハイブリダイズする。これらのプライマーと一緒に、完全長のhMOR1 cDNA配列の一部を含む、82塩基対の生成物の増幅を触媒する。

検出は、5'-CCAGACTGTTTCTTGGCACTTCTGCATTG-3' (配列番号：4) を有する  
5 N-945Tをプローブとして用いて行った。このプローブは、hMOR1 cDNA (配列番号：1) 内の1157-1185位の相補配列にハイブリダイズする。

前記のTaqMan形式での検出を可能にするために、前記プローブは、5' 10 端にフルオレセイン型の蛍光色素 (FAM：リポーター) 3' 端にローダミン型の蛍光色素 (TAMRA：クエンチャー) を標識した。

標識したプローブは、ハイブリダイズしない状態の場合には、蛍光共鳴エネルギーの移動現象により、リポーターの蛍光は抑制される。DNAポリメラーゼによる前記プローブの伸長を、増幅の間防ぐために、前記プローブの3' 末端はリン酸ブロックで合成した。

15

#### (4) 増幅

各々のPCR増幅は、TaqMan (商標) Universal PCR Master MIX (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) を用いて、20μlの合計反応液量で行った。最終試薬濃度を以下の様にした：試料遺伝子、1× TaqMan (商標) Universal PCR Master  
20 MIX (AmpliTa q Gold (商標) DNA Polymerase、AmpErase (商標) Uracil-N-glycosylase (UNG)、ROXなどを含む。)、900nM 各プライマー、200nM プローブ。

増幅反応は、ABI PRIZM (商標) 7900HT配列検出システム (ア  
25 プライドバイオシステムズジャパン株式会社) で行い、使用した温度周期のプロファイルを以下に示す。

サーマルサイクリングの時間及び温度AmpErase UNG反応のインキュベーション：50℃で2分間、AmpliTa q Gold DNA Polymeraseの活性化：95℃で10分間、変性・アニール/伸長：40

サイクル： 95℃で15秒間、60℃で1分間。

(5) 定量的TaqMan解析

TaqMan反応において、増幅の間に、前記DNAポリメラーゼの5' - 3' エキソヌクレアーゼ活性により、前記標的配列にハイブリダイズするプローブは5' 末端から加水分解される。その結果、リポーター蛍光色素は遊離し、蛍光強度が増加する。

増幅生成物の蓄積は、反応液の、リポーター蛍光色素の蛍光強度の増加を測定することによって、測定した。また、同時に、反応液の、実験誤差補正用の蛍光リファレンス（蛍光色素：ROX）の蛍光強度も測定した。各々の増幅サイクルの間、前記リポーター蛍光色素、及びリファレンス蛍光色素は、その最大の励起に近い波長の光で励起し、そして前記リポーター蛍光色素、及びリファレンス蛍光色素の発光は、その発光の最大付近で測定される。これらの周波数は、ABI PRIZM（商標）7900HT配列検出システムであらかじめ決定され、別の検出機器を使用したならば、適当な周波数を選択すべきである。

蛍光測定値は、7900HT SDSソフトウェア（アプライドバイオシステムズジャパン株式会社）により解析した。まず、リポーター蛍光色素の蛍光強度をリファレンス蛍光色素の蛍光強度で標準化し、標準化リポーターシグナル（ $R_n$ ）を算出した。更に、 $R_n$ から、PCR初期サイクルのサイクルの間で比較的一定な $R_n$ の平均値（ベースライン）を差し引いた値を $\Delta R_n$ とした。サイクル数に対して $\Delta R_n$ をプロットした増幅曲線上で、増幅産物の指数関数的増幅に相当する蛍光シグナル（ $\Delta R_n$ ）の増加を解析アルゴリズムが初めて検出したサイクル数をThreshold Cycle ( $C_T$ )とした。具体的には、この $C_T$ を決定するために、増幅産物の指数関数的増幅に至っていないと考えられるPCR初期サイクル（3 - 15サイクル）をベースラインとして、このサイクル内の平均 $\Delta R_n$ の標準偏差を計算した。次にこの標準偏差を10倍した値をThresholdと定義し、各増幅曲線上でこのThresholdの値に相当するサイクル数を $C_T$ とした。

前記の増幅産物の指数関数的増幅期の間、 $C_T$ は、最初の標的コピー数の対数

に比例する。後期のサイクルにおける増幅生成物の蓄積は、反応を阻害し、そしてついには反応のプラトーをもたらす。

## (6) 結果

- 5 各試料で得た  $C_T$  値を、以下に示す。各  $C_T$  値は、4回の反応から得た平均値を表わす。

試料  $C_T$  値

	$10^7$ コピーの hMOR 1 T/M	16.3
	$10^6$ コピーの hMOR 1 T/M	19.2
10	$10^5$ コピーの hMOR 1 T/M	22.5
	$10^4$ コピーの hMOR 1 T/M	26.0
	$10^3$ コピーの hMOR 1 T/M	29.2
	$10^2$ コピーの hMOR 1 T/M	32.9
	0 コピーの hMOR 1 T/M	40.0以上

15

検量線は、既知量の hMOR 1 COM の鋳型 (標準サンプル) の増幅から得た、 $C_T$  値から導いた。具体的には標準サンプルの初期既知量 (対数值) に対して  $C_T$  をプロットし、検量線を作成した。近似曲線には  $C_T = (\text{Log} [\text{DNA}]_T - \text{Log} [\text{DNA}]_0) / \text{Log} (1 + e)$  (ここで、 $[\text{DNA}]_0$  は標的テンプレート  
20 の初期濃度であり、 $[\text{DNA}]_T$  は、 $C_T$  サイクル時の増幅産物の濃度であり、 $e$  は、平均増幅効率であり、そして  $\text{Log} (X)$  は、 $X$  が 10 の底を表す対数である) の一次方程式を用い、7900HT SDS ソフトウェアにより、パラメーターを定めた。

前記の試料から得た  $C_T$  値から、以下の検量線を得た：

25  $C_T = 39.34 - 3.331 \times \text{Log} [\text{DNA}]_0$

相関係数  $R^2 = 0.999$

平均増幅効率  $e = 99.6\%$

実施例 2

(1) RNAの抽出およびcDNA合成

前立腺癌細胞LNCaP-FGC細胞をプレコンフルエントになるまで培養した。細胞を0.25%トリプシン-1mM EDTA (Invitrogen社) ではがし細胞数を測定した後、RNeasy mini KIT (QIAGEN社) のマニュアルに従って全RNAを抽出精製した。抽出したRNAはSuperScript II (Invitrogen社) のマニュアルに従ってfirst strand cDNAを合成し、エタノール沈殿後下記のように溶解して用いた。合成したcDNAは10mg/ml RNA相当になるようにTEに溶解した後、50μg/mlの酵母tRNAを含むTEに5ng/μlになるように希釈した。希釈したcDNA溶液5μl (25ngのRNAに相当) を1種類のGPCRのmRNAの定量の測定用試料とした。

(2) 化学合成標準品を用いたGPCR mRNAの定量

既知のGPCR 160種類の配列を基に、ソフトウェアPrimer Express (商標) (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) を用いてプライマーおよびプローブを設計した。また、プライマーには含まれた塩基配列を持つ(-)鎖のDNAを化学合成した。化学合成したDNAを50μg/mlのyeast tRNAを含むTEに10<sup>6</sup>コピー/5μlになるように希釈した後、10倍づつ10<sup>2</sup>コピー/5μlになるまで希釈系列を作成した。1種類のGPCRのmRNAの測定は、これらの化学合成品による希釈系列5種と前述した測定サンプル1種の5μlずつを各2点分注して行った。増幅反応試薬は、TaqMan(商標) Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) および、前述のように設計したTaqMan(商標) Probe Kit (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) を用い、15μlの液量に調製したのち、前述の標準品および測定試料の入った各ウェルに加えた。各プライマー、プローブの最終濃度はマニュアルに従った。TaqMan(商標) PCRは、ABI PRISM(商標) 7900HT配列検出システム (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) で行い、使用した温度周期はTaqMan(商標) Universal PCR Master Mix (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) のマニュアルに従った。

増幅生成物の定量的TaqMan解析は、7900HT SDSソフトウェア (アプライドバイ

オシシステムズジャパン株式会社)を用いて行った。上記の条件を用いて384ウェルプレート1枚で32種類のGPCRの定量的測定を行い、5枚の384ウェルプレートを用いることにより前立腺癌細胞株LNCaP-FGC細胞の発現する前述した160種類全てのGPCRの正確な定量が可能であった。

5

#### 産業上の利用可能性

本発明の標準品は、化学合成によって得られる合成ポリヌクレオチドであり、従来の生合成によって得られるポリヌクレオチドからなる標準品と比較して、簡便な方法で目的とする配列のものを正確に得ることができるという利点がある。

10 また、本発明の標準品は、生物学的コンタミネーションがないので、環境に対して安全であり、また高精度の定量を阻害する要因を少なくできるという利点がある。

15 また、本発明の定量方法及び定量キットによれば、標準品として1本鎖のポリヌクレオチドを用いた場合は、被定量物に近い状態のものを標準とすることができるので、より高精度の定量が可能となる。

また、本発明の他の態様に係る定量方法及び定量キットによれば、多種類の標的核酸を含み得る試料について、多種類の標的核酸の有無及びその量を一度の処理で高感度で検出することができる。したがって、本発明によれば、標的遺伝子の発現解析を高感度で迅速に行うことができるシステムを提供することができる。

20

さらに、本発明の定量方法および定量キットを用いることによって、特定疾患の診断、遺伝子組換え食品の検査または自然食品中の遺伝子組換えDNAの混入の判定などを高精度で行うことができる。

## 請求の範囲

1. 化学合成によって得られる合成ポリヌクレオチドを含む、試料中の特定の標的核酸を定量または検出する際に用いられる標準品。
2. 前記合成ポリヌクレオチドがRNA、DNA又はそれらの修飾物である請求項1記載の標準品。
3. 前記合成ポリヌクレオチドがRNAまたはDNAである請求項1記載の標準品。
4. 前記合成ポリヌクレオチドがRNAのときにセンス鎖、あるいはDNAのときにアンチセンス鎖である請求項3記載の標準品。
5. 前記合成ポリヌクレオチドが標的核酸の一部を合成したものであって、ヌクレオチドの数が60～200個である請求項1記載の標準品。
6. 前記請求項1～5のいずれかに記載の標準品を含む核酸定量キット。
7. 前記請求項1～5のいずれかに記載の標準品と少なくとも1対のプライマー対を含む核酸定量キット。
8. さらに蛍光プローブまたはリン酸化プローブを含んでなる請求項7記載のキット。
9. さらにDNAポリメラーゼを含んでなる請求項8記載のキット。
10. さらに逆転写酵素を含む請求項9記載のキット。
11. 複数の標的核酸を定量するための核酸定量キットであって、複数の反応場所を有する反応器具の各反応場所に、標的核酸に対応するプライマー対を含む増幅試薬を充填し、その標的核酸に対応するプライマー対を充填していない反応場所に前記請求項1～5のいずれかに記載の標準品とその標準品に対応するプライマー対を含む増幅試薬を充填してなる核酸定量キット。
12. 前記複数の標的核酸が特定疾患に関与するDNAまたはmRNAであり、その特定疾患を診断するために用いられる請求項11記載の核酸定量キット。
13. 前記複数の標的核酸が遺伝子組換え食品に含有される組換えDNAであり、食品中の組換えDNAを検知するために用いられる請求項11記載の核酸定量キット。
14. 試料中の特定の標的核酸を定量する方法であって、試料に標的核酸に対応



する少なくとも一対のプライマー対をそれぞれ含む増幅試薬を加え、標準品としての化学合成ポリヌクレオチドにその合成ポリヌクレオチドに対応するプライマー対を含む増幅試薬を加えて、それぞれ増幅反応を行い、増幅された標準品の量と増幅された標的核酸の量を測定し、これらの情報に基づいて増幅前の標的核酸の量を計算する核酸の定量方法。

5

15. 前記合成ポリヌクレオチドがRNA、DNA又はそれらの修飾物である請求項14記載の方法。

16. 前記合成ポリヌクレオチドがRNAである請求項14記載の方法。

17. 前記合成ポリヌクレオチドがセンス鎖である請求項16記載の方法。

10

18. 前記合成ポリヌクレオチドが標的核酸の一部を合成したものであって、ヌクレオチドの数が60～200個である請求項14～17記載の方法。

19. 前記試料がヒトまたはその他の動物由来のmRNA試料である請求項14～18記載の方法。

15

20. 前記増幅試薬がさらに蛍光プローブまたはリン酸化プローブを含んでなる請求項19記載の方法。

21. 前記増幅試薬がさらにDNAポリメラーゼを含んでなる請求項20記載の方法。

22. 前記増幅試薬がさらに逆転写酵素を含む請求項21記載の方法。

20

23. (1) 標的核酸に対応する少なくとも一対のプライマー対をそれぞれ含む増幅試薬に含まれる蛍光プローブまたはリン酸化プローブのプローブ部分が、標的核酸のうち該プライマー対に挟まれる領域の核酸からなるプローブであり、

(2) 合成ポリヌクレオチドに対応するプライマー対を含む増幅試薬に含まれる蛍光プローブまたはリン酸化プローブのプローブ部分が、合成ポリヌクレオチドのうち該プライマー対に挟まれる領域の核酸からなるプローブである請求項20

25

～22記載の方法。

24. DNAポリメラーゼによって蛍光プローブまたはリン酸化プローブから遊離される蛍光物質の蛍光強度またはリン酸基の量を指標として、増幅された標準品の量と増幅された標的核酸の量を測定する請求項23記載の方法。

25. 前記請求項11記載のキット又は前記請求項14の方法を用いてSNPの

解析を行う方法。

26. 前記請求項12記載のキット又は前記請求項14の方法を用いて特定疾患を診断する方法。

27. 前記請求項13記載のキット又は前記請求項14の方法を用いて食品中に遺伝子組換えDNAが含まれているか否かを判定する方法。

28. 前記請求項12記載のキット又は前記請求項26記載の方法によって特定される、ある細胞や組織において特徴的に発現が亢進または減少している遺伝子DNAもしくはその遺伝子産物、又はその遺伝子産物に対するアゴニスト、アンタゴニストもしくは抗体を含んでなる医薬。

## [Sequence Listing]

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Quantification Method and Quantification Kit of Nucleic Acids

<130> P02-0156PCT

<150> JP 2001-400280

<151> 2001-12-28

<160> 10

<210> 1

<211> 2162

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221>

<223> (2063), (2091)

<224>

<400> 1

ggaattccgg ctataggcag aggagaaatgt cagatgctca gctcggtccc ctccgcctga	60
cgctcctctc tgtctcagcc aggactggtt tctgtaagaa acagcaggag ctgtggcagc	120
ggcgaaagga agcggctgag gcgcttgga cccgaaaagt ctcggtgctc ctggctacct	180
cgcacagcgg tgcccccccg gccgtcagta ccatggacag cagcgtgcc cccacgaacg	240

ccagcaattg cactgatgcc ttggcgtact caagttgctc cccagcaccc agccccgggt 300  
cctgggtcaa cttgtccac ttagatggca acctgtccga cccatgcggt ccgaaccgca 360  
ccaacctggg cgggagagac agcctgtgcc ctccgaccgg cagtcacctcc atgatcacgg 420  
ccatcacgat catggccctc tactccatcg tgtgctgtgt ggggctcttc ggaaacttcc 480  
tggtcatgta tgtgattgtc agataacca agatgaagac tgccaccaac atctacattt 540  
tcaaccttgc tctggcagat gccttagcca ccagtacctt gcccttccag agtgtgaatt 600  
acctaattgg aacatggcca tttggaacca tcctttgcaa gatagtgatc tccatagatt 660  
actataacat gttcaccagc atattcacc tctgcaccat gagtggtgat cgatacattg 720  
cagtctgcca ccctgtcaag gccttagatt tccgtactcc ccgaaatgcc aaaattatca 780  
atgtctgcaa ctggatcctc tcttcagcca ttggctcttc tgtaatgttc atggctacaa 840  
caaaatacag gcaaggttcc atagattgta cactaacatt ctctcatcca acctggtact 900  
gggaaaacct cgtgaagatc tgtgttttca tcttcgcctt cattatgcca gtgctcatca 960  
ttaccgtgtg ctatggactg atgatcttgc gcctcaagag tgtccgcatg ctctctggct 1020  
ccaaagaaaa ggacaggaat cttcgaagga tcaccaggat ggtgctggtg gtggtggctg 1080  
tgttcatcgt ctgctggact ccatttcaca tttaagtcatt cattaaagcc ttggttacia 1140  
tcccagaaac tacgttccag actgttttctt ggcacttctg cattgctcta ggttacacaa 1200  
acagctgcct caaccagtc ctttatgcat ttctggatga aaacttcaa cgatgcttca 1260  
gagagttctg tateccaacc tcttccaaca ttgagcaaca aaactccact cgaattcgtc 1320  
agaacactag agaccacccc tccacggcca atacagtga tagaactaat catcagctag 1380  
aaaatctgga agcagaaact gctccgttgc cctaacaggg tctcatgcca ttccgacctt 1440  
accaagctt agaagccacc atgtatgtgg aagcaggtt cttcaagaat gtgtaggagg 1500  
ctctaattct ctaggaaagt gcctactttt aggtcatcca acctctttcc tctctggcca 1560  
ctctgctctg cacattagag ggacagccaa aagtaagtgg agcatttgga aggaaaggaa 1620  
tataccacac cgaggagtcc agtttgtgca agacaccag tggaaccaa acccatcgtg 1680  
gtatgtgaat tgaagtcac ataaaagggt acccttctgt ctgtaagatt ttattttcaa 1740  
gcaaattttt atgacctcaa caaagaagaa ccatcttttg ttaagttcac cgtagtaaca 1800  
cataaagtaa atgctacctc tgatcaaagc acctggaatg gaaggtccga gtcttttttag 1860  
tgtttttgca agggaatgaa tccattatc tatttttagac ttttaacttc aacttaaaat 1920  
tagcatctgg ctaaggcatc attttcacct ccatttcttg gttttgtatt gtttaaaaaa 1980

aataacatct ctttcatcta gctccataat tgcaagggaa gagattagca tgaaaggtaa 2040  
tctgaaacac agtcatgtgt canctgtaga aaggttgatt ctcatgcact ncaaatactt 2100  
ccaaagagtc atcatggggg atttttcatt cttaggcttt cagtggtttg ttcttggaa 2160  
tc 2162

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer N917F

<400> 2

ccttggttac aatcccagaa actac 25

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer N-998R

<400> 3

aggcagctgt ttgtgtaacc taga 24

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> misc\_binding

<223> Probe N-945T, labeled 5' -terminal with FAM and 3' -terminal with TAMRA

<400> 4

ccagactggtt tcttggcact tctgcattg

29

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 5

ccttcgcaag acccttcctc tata

24

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 6

gtagctgtcg gtgtagtcct cgt

23

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 7

ttacggcgag ttctgtagg

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 8

catgtgcctg agaaataggc

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 9

aaaagagctg tcctgacagc

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 10

tcctcctgca tcaattgtgt

20



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
 PCT/JP02/13782

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

 Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/566, A61K45/00, A61K39/395,  
 A61K48/00, A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

 Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/566, A61K45/00, A61K39/395,  
 A61K48/00, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/46463 A2 (BAXTER AG.), 28 June, 2001 (28.06.01), & US 2002/102548 A1 & EP 1244814 A2	1-27
A	JP 2001-95576 A (Shimadzu Corp.), 10 April, 2001 (10.04.01), (Family: none)	1-27
A	JP 11-9281 A (Shimadzu Corp.), 19 January, 1999 (19.01.99), (Family: none)	1-27
A	WO 91/02817 A (Rosh), 07 March, 1991 (07.03.91), & US 5219727 A & EP 497784 A & JP 5-504886 A	1-27



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

 Date of the actual completion of the international search  
 01 April, 2003 (01.04.03)

 Date of mailing of the international search report  
 15 April, 2003 (15.04.03)

 Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP02/13782

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 28  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Concerning "a drug containing a gene DNA, a gene product, an agonist, an antagonist or an antibody" as set forth in claim 28, no specific compound contained in the drug but merely general statement is given in the description. Thus, it is unknown what specific substances are (continued to extra sheet)
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International Application No.

PCT/JP02/13782

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet (1)

contained in the above drug. Such being the case, no meaningful international search can be made on claim 28.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/566, A61K45/00, A61K39/395, A61K48/00, A61P43/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/566, A61K45/00, A61K39/395, A61K48/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 01/46463 A2 (BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT) 2001. 06. 28 & US 2002/102548 A1 & EP 1244814 A2	1-27
A	JP 2001-95576 A (株式会社島津製作所) 2001. 04. 10 (ファミリーなし)	1-27
A	JP 11-9281 A (株式会社島津製作所) 1999. 01. 19 (ファミリーなし)	1-27
A	WO 91/02817 A (Rosh) 1991. 03. 07 & US 5219727 A & EP 497784 A & JP 5-504886 A	1-27

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 04. 03

国際調査報告の発送日

15.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

光本 美奈子

4 B

9 3 5 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 28 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
請求の範囲28の「遺伝子DNA、遺伝子産物、アゴニスト、アンタゴニストもしくは抗体を含んでなる医薬」について、明細書には一般的な記載があるのみであり、上記医薬に含まれる具体的な化合物については何ら記載されていない。してみると、上記医薬には具体的にどのような物質が包含されるのかが不明であるから、請求の範囲28については、有意義な国際調査をすることができない。
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。